

0-772064

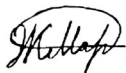
На правах рукописи

МАРКИНА Жанна Васильевна

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА МОРСКОЙ ВОДЫ
И ДЕЙСТВИЯ ДЕТЕРГЕНТОВ**

03.00.18 – гидробиология
03.00.16 – экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Владивосток - 2008

Работа выполнена в Лаборатории физиологии
Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Научный руководитель

кандидат биологических наук, доцент Айздайчер
Нина Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Бузолева Любовь Степановна

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Латыпов Юрий Яковлевич

Ведущая организация

Московский государственный университет им.
М.В. Ломоносова

Защита состоится 17 октября 2008 г. в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д 005.008.02 при Институте биологии моря им. А.В.
Жирмунского ДВО РАН по адресу:

690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17, факс (4232) 310900.
Электронный адрес: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Автореферат разослан 10 сентября 2008 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000467735

Ученый секретарь
диссертационного совета

кандидат биологических наук

Костина Е.Е.

Актуальность работы

Одноклеточные водоросли – важный компонент морских экосистем. Они одни из первых страдают от воздействия токсических веществ, что приводит к нарушению функционирования всей экосистемы (Патин, 1979; Эколого-токсикологические..., 1985; Blasco et al., 2003). В морскую среду попадают различные токсиканты, в том числе детергенты и их основной компонент – поверхностно-активные вещества (ПАВ). Действие этих веществ на микроводоросли является многофакторным, что выражается в изменении функционирования клеток и их гибели. С другой стороны, наличие в составе детергентов фосфорных компонентов способствует евтрофикации, последствия которой ведут к увеличению числа клеток отдельных видов водорослей при одновременном снижении видового разнообразия (Lewis, Hamm, 1986; Брагинский и др., 1987; Паршикова, Нергуцкий, 1988; Belanger et al., 2002; Lizotte et al., 2002; Wong et al., 2003).

В настоящее время в исследованиях с микроводорослями оценивается только влияние ПАВ, а не детергентов в целом (Aidar et al., 1997; Utsunomia et al., 1997a,b; Hampel et al., 2001; Morreno-Garrido et al., 2001; Sun et al., 2004 и др.). В связи с этим, наряду с изучением воздействия отдельных ПАВ необходимо оценивать воздействие детергентов (Патин, 1979; Lewis, 1992; Жмур, 1997; Pettersson et al., 2000; Остроумов, 2001). При этом важно исследовать действие токсических агентов как на рост, так и на физиологическое состояние одноклеточных водорослей.

Среди огромного разнообразия микроводорослей наиболее часто для оценки действия веществ применяются обитающие в планктоне водоросли отдела Chlorophyta, в то время как представители других отделов остаются малоизученными (Lewis et al., 1990a, Hampel et al., 2001), что особенно касается бентосных микроводорослей (Morreno-Garrido et al., 2003a,b).

Загрязнение морской воды является комплексным и, следовательно, оценку его характера и действия можно провести только с помощью биотестирования, которое средством получения принципиально новой информации о загрязнении (Флеров, 1983; Крайнюкова, 1988; Жмур, 1997; Черкашин, 2001; Терехова, 2003). Одноклеточные водоросли, вследствие круглогодичной доступности и высокой

чувствительности, широко применяются в качестве тест-объектов при биотестировании (Walsh, Gurnes, 1983; Крайнюкова, 1988; Lewis, 1995; Жмур, 1997; Руководство, 2002). В то же время микроводоросли для биотестирования вод зал. Петра Великого Японского моря до настоящего времени не использовали.

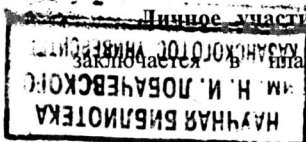
В связи с вышеизложенным очевидна актуальность исследования влияния ПАВ и детергентов на микроводоросли, а также возможность применения данных организмов в качестве тест-объектов для биотестирования прибрежных морских вод.

Цель работы заключалась в изучении действия детергентов и прибрежных вод зал. Петра Великого Японского моря на микроводоросли разных систематических групп.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать чувствительность микроводорослей *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta), *Plagioselmis prolunga* Butch. (Cryptophyta), *Attheya ussurensis* Stonik, Orlova & Crawford (Bacillariophyta) к модельному токсиканту бихромату калия.
2. Выявить, используя в качестве модельного объекта *D. salina*, оптимальные условия опыта (возраст, численность клеток, время введения токсиканта) для изучения влияния ПАВ и детергентов и оценки качества вод.
3. Исследовать действие поверхностно-активного вещества и детергентов на динамику численности клеток, скорость их роста, изменение pH культуральной среды, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов и кислородную продуктивность микроводорослей *D. salina*, *A. ussurensis*, *P. prolunga*.
4. Исследовать действие поверхностно-активного вещества и детергентов на подвижность клеток *P. prolunga* и скорость их движения.
5. Показать возможность биотестирования прибрежных вод зал. Петра Великого с помощью микроводорослей *D. salina* и *P. prolunga*.

Личное участие в получении научных результатов. Личное участие заключалось в планировании и проведении экспериментальной работы.



Самостоятельно осуществляла микроскопические и химические методы исследования, интерпретацию полученных данных и формулирование научных выводов. Все заимствованные данные, использованные в работе, имеют ссылки на их источники.

Научная новизна: впервые оценена степень чувствительности микроводорослей *D. salina*, *P. prolunga* и *A. ussurensis* по их реакции на модельный токсикант бихромат калия. Исследовано применение новых тест-объектов: микроводорослей *P. prolunga* и *A. ussurensis* при изучении действия ПАВ и детергентов, а также качества морских вод на примере зал. Петра Великого Японского моря. Установлено, что подвижность клеток *P. prolunga* – наиболее чувствительный показатель к действию ПАВ и детергентов, который может быть использован для тестирования морской воды.

Практическая значимость: полученные сведения пополняют знания о действии ПАВ и детергентов на микроводоросли. Эти данные могут быть использованы при разработке систем оценки действия ПАВ и детергентов. Данные, полученные в ходе биотестирования прибрежных вод зал. Петра Великого с помощью микроводорослей, дают дополнительную информацию о свойствах загрязнения прибрежных вод залива и их действия на морскую биоту. Они могут быть использованы при проведении мониторинга качества морских вод и при оценке среды в районах развития марикультурных хозяйств. Разработанные методики по определению действия ПАВ и детергентов применяли на практических работах в курсе “Большой практикум” для студентов-экологов.

Защищаемые положения:

1. ПАВ и детергенты оказывают влияние на *D. salina*, *A. ussurensis* и *P. prolunga* в концентрациях 0,1, 1 и 10 мг/л. Воздействие токсикантов усиливается с возрастанием их концентраций.
2. Наиболее чувствительным показателем действия ПАВ и детергентов является подвижность клеток *P. prolunga*, что позволяет использовать ее для оценки качества морских вод.

Апробация работы. Результаты и основные положения работы докладывались на V, VI, VII Региональных конференциях по актуальным проблемам морской биологии, экологии и биотехнологии (Владивосток, 2002;

2003; 2004), VII и IX международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2004, 2005), Международной конференции “Bridges of science between north America and the Russian Far East: past, present and future” (Владивосток, 2004), IX и X дальневосточных молодежных школах-конференциях по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2005; 2006), II Международной конференции “Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов” (Петрозаводск, 2007) и ежегодных конференциях ИБМ ДВО РАН (2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Фонда содействия отечественной науке (2007; 2008 гг.).

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 122 страницах и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы (191 источник, из них 87 иностранных). Работа включает 6 таблиц и 23 рисунка.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Н.А. Айздайчер за помощь на всех этапах планирования и выполнения работы. Особую признательность выражаю доценту Е.В. Журавель за интерес к работе и участие в обсуждении результатов исследования, д.б.н. В.П. Челомину, к.б.н. Л.Т. Ковековдой и к.б.н. Г.М. Каменеву за критические замечания и ценные советы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обобщены литературные сведения о составе детергентов, рассмотрена классификация ПАВ. Представлены сведения об источниках и объемах содержания ПАВ в морских водах. Проанализированы данные о микроводорослях как объектах экотоксикологических исследований. Рассмотрено влияние анионных ПАВ и детергентов на динамику численности, физиологическое состояние и биохимический состав микроводорослей.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и условия эксперимента

Оценку действия ПАВ и детергентов проводили на *D. salina* (Chlorophyta), *P. prolonga* (Cryptophyta) и *A. ussurensis* (Bacillariophyta).

D. salina – планктонная подвижная водоросль. Выбор в качестве объекта исследования обусловлен широким применением ее для оценки токсичности веществ и качества вод. *P. prolonga* также планктонный активно подвижный вид. Преимуществом этой водоросли является способность оставаться подвижной при пересеве в свежую среду в отличие от *D. salina*, которая кратковременно утрачивает подвижность в данных условиях. Необходимость исследования *P. prolonga* связана с широким распространением криптофитовых в прибрежных водах дальневосточных морей, ее подвижностью, значительной ролью в экосистемах, способностью вызывать “красные приливы”, в том числе и в Амурском заливе Японского моря (Коновалова, 1999; Бегун, 2006). *A. ussurensis* является бентосным видом, обитающим в зал. Петра Великого (Stonik et al., 2006); необходимость исследования данной водоросли связана, прежде всего с тем, что количество работ по бентосным микроводорослям ограничено. Сходство исследованных водорослей заключается в наличии основного пигмента – хлорофилла *a*. Кроме того, все виды микроводорослей соответствуют одному из важных требований к тест-объектам – они легко и в течение длительного времени поддерживаются в лабораторной культуре.

Тест-объектами для биотестирования вод зал. Петра Великого служили *D. salina* как часто применяемая для данных целей водоросль (Стом и др., 1984; Балааян, Стом, 1988; Рудик и др., 1995) и *P. prolonga* – организм, предложенный нами в качестве нового тест-объекта, дающий оперативный отклик на загрязнение и обладающий чувствительным показателем – подвижностью клеток (Айздайчер, Маркина, 2006; Маркина, 2008).

Альгологически чистую культуру микроводоросли *D. salina* выращивали на среде Гольдберга (Кабанова, 1961), *P. prolonga* и *A. ussurensis* – на среде *f* (Guillard, Ryther, 1962). Водоросли культивировали при температуре 20±2°C и светотемновом периоде 12 ч свет: 12 ч темнота.

Для проверки чувствительности культур микроводорослей оценивали действие модельного токсиканта бихромата калия производства фирмы “Sigma” в

концентрациях 1 до 10 мг/л (Руководство..., 2002). Среднюю эффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) для бихромата калия устанавливали графическим способом, применяя пробит-анализ (Руководство, 2002).

В опытах исследовали влияние додецилсульфата натрия (ДСН) производства фирмы “Serva” (Германия) и используемых в быту детергентов “Обычный порошок” (Байкальская косметика) и “Ariel” (Procter & Gamble) в концентрациях 0.1; 1 и 10 мг/л. Уровень содержания 0.1 мг/л ПАВ соответствует ПДК для рыбохозяйственных водоемов в России (Перечень..., 1995). Концентрации до 1 мг/л токсикантов отмечены в морских водах (Остроумов, 2001), а в некоторых случаях уровень их содержания может достигать до 97 мг/л (Наумов, 2006), поэтому нами также исследована концентрация 10 мг/л токсикантов.

Продолжительность опытов – 4 сут при выяснении действия модельного токсиканта (бихромата калия), 14 сут при оценке влияния ПАВ и детергентов на микроводоросли, для биотестирования морской воды – 7 сут (Руководство..., 2002).

Для оценки действия загрязняющих агентов использовали численность клеток, скорость их роста – показатели часто применяемые для оценки токсического действия. Как указывает Брагинский с соавторами (1987), содержание фотосинтетических пигментов и кислородная продуктивность – также интегральные показатели действия токсикантов на микроводоросль, отражающие изменение всей совокупности метаболических процессов организма.

Подсчет численности клеток. В настоящей работе для определения интенсивности роста культур водорослей использовали подсчет численности клеток. В связи с этим термин “рост” означает увеличение численности клеток в единице объема. Численность клеток *D. salina* и *P. prolonga* считали в камере Горяева; клетки *A. ussurensis* – в счетной камере типа Ножотта объемом 0.044 мл под микроскопом “Jenamed 2” на 1, 2, 3, 4, 7, 10 и 14 сут экспериментов (Методы..., 1975; Методические..., 1998).

Скорость роста рассчитывали в начале и в конце экспоненциальной фазы (на 1 и 4 сут эксперимента) по стандартной формуле (Guillard, Ryther, 1962).

Измерение pH культуральной среды проводили с помощью pH-метра HI 8314 фирмы “Hanna” с точностью до 0.01 через 1, 2, 3, 4, 7, 10 и 14 сут опытов.

Определение содержания хлорофилла *a* и суммарной концентрации каротиноидов у микроводорослей проводили по стандартной методике (Lorenzen, 1967; Jeffrey, Humphrey, 1975; Вода, 1990). Отбор проб для определения концентрации фотосинтетических пигментов производили на 2, 4, 7, 10 и 14 сут опытов.

Кислородную продуктивность микроводорослей определяли йодометрическим методом (Методы..., 1975) на 2, 4, 7, 10 и 14-е сут.

Определение **скорости движения клеток** производили в счетной камере Горяева путем подсчета количества клеток, проходящих через заданную поверхность за 60 сек, и вычисляли скорость движения клеток, используя формулу (Ojakian, Katz, 1973)

Краткая характеристика района работ. Тестируемая вода отбиралась из акваторий с разной степенью антропогенной нагрузки: Амурский залив, на берегах которого расположен крупный город-порт Владивосток, зал. Восток, испытывающий сезонное влияние отдыхающих, и юго-западной части зал. Петра Великого вблизи устья р. Туманной, поставляющей широкий спектр загрязняющих веществ (Вашенко, 2000; Наумов, 2006). Воду для биотестирования отбирали на 10 станциях в августе – сентябре 2003 и 2006 гг. (глубина отбора воды 0.5 – 1 м) (рис. 1).



Рис. 1. Расположение станций отбора проб воды.

Все эксперименты, представленные в работе, проведены в трех повторностях. На графиках средние арифметические значения и стандартные отклонения рассчитаны с помощью программы Excel.

Всего обработано 1473 пробы.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка токсичности веществ и качества среды с помощью лабораторных тест-объектов предполагает не только точное следование методике и условиям, при которых проводится биотестирование, но и проверку тест-функций самих культур. Использование бихромата калия наиболее подходит для этих целей (Жмур, 1997; Петросян, 2000; Руководство..., 2002). Нами показано, что *D. salina* оказалась гораздо устойчивее к действию бихромата калия по сравнению с остальными микроводорослями, в то время как *P. prolunga* и *A. ussurensis* незначительно отличались друг от друга по чувствительности (см. таблицу).

ЭК₅₀⁹⁶ бихромата калия (мг/л) для микроводорослей

Микроводоросль	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Plagioselmis prolunga</i>	<i>Attheya ussurensis</i>
ЭК ₅₀ ⁹⁶ бихромата калия (мг/л)	> 10	6.3	2.8

Следовательно, *A. ussurensis* и *P. prolunga* являются потенциальными тест-объектами, так как они чувствительны к бихромату калия.

Действие любого загрязняющего агента на микроводоросли зависит не только от уровня его содержания и условий, при которых проводится биотестирование, но и от самой культуры микроводорослей (возраста маточной культуры, начальной концентрации клеток и времени введения токсиканта). В связи с этим нами были проведены исследования по выяснению действия ПАВ на модельный объект *D. salina* в зависимости от этих условий. Наши исследования показали, что культура *D. salina*, выращенная из маточной в экспоненциальной фазе роста, оказалась наиболее чувствительной к воздействию ДСН. Это, вероятно, связано с тем, что на разных стадиях роста культуры клетки отличаются особенностями ультраструктуры и функциональной активностью органоидов (Селях и др., 1984; Walsh, 1988). В результате экспериментов показано, что культура с меньшей исходной плотностью клеток чувствительнее к влиянию токсиканта, чем с большей. Это, вероятно, связано с тем, что в растворах с одинаковым содержанием токсиканта при более высокой начальной концентрации

клеток на каждую особь приходится меньшее содержание токсиканта, вследствие этого такая популяция устойчивее, чем с меньшим количеством клеток. Реакция водорослей на токсикант зависит также от времени его внесения в среду. Возможно, что более слабый отклик микроводоросли на внесение токсиканта не в самом начале опыта, а через несколько дней, связан с тем, что популяция к этому времени является уже сформированной (Fogg, 1966), и ее устойчивость к действию токсикантов повышается в 10 – 100 раз и не происходит массовой гибели клеток, как в молодой культуре (Cotte et al., 1996; Гапочка, Шавырина, 1999).

Таким образом, наиболее чувствительной к действию ДСН оказалась культура, отобранная из маточной в экспоненциальной фазе роста. При исходном количестве клеток 4×10^4 кл/мл восстановление культуры при токсическом действии происходит быстрее, чем при 12×10^4 кл/мл. Добавление ДСН в день постановки опыта вызывало большее угнетение роста популяции микроводоросли, что не отмечено при внесении токсиканта на 4-е сут опыта.

Dunaliella salina

ДСН в концентрации 0.1 мг/л оказал слабое стимулирующее действие на динамику численности (рис. 2а) и физиологические процессы *D. salina* (синтез хлорофилла *a* и каротиноидов и кислородную продуктивность), pH культуральной среды также возрастала. Внесение 1 мг/л токсиканта приводило к небольшому ингибированию роста, уменьшению содержания хлорофилла *a* и каротиноидов, снижению кислородной продуктивности. Увеличение содержания вещества в среде до 10 мг/л вызывало подавление роста и физиологических процессов водоросли, однако они восстанавливались до контрольного уровня.

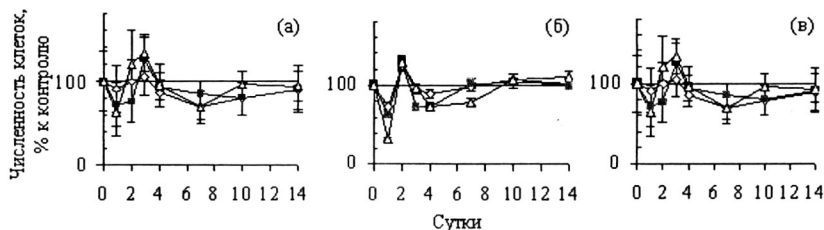


Рис. 2. Действие додецилсульфата натрия (а), детергентов “Обычный порошок” (б) и “Aigel” (в) на динамику численности клеток *Dunaliella salina*.

При добавлении детергентов “Обычный порошок” и “Ariel” во всех концентрациях численность клеток (рис. 2б,в), pH культуральной среды, содержание фотосинтетических пигментов и содержание кислорода в среде снижались в начале опыта, однако все показатели восстанавливались до уровня контроля к его завершению. Степень изменений возрастала с увеличением уровня содержания загрязняющего агента.

Attheya ussurensis

ДСН в концентрациях 0.1 и 1 мг/л вызывал снижение числа клеток (рис 3а) и подавление физиологических процессов, особенно выраженных к концу опыта. Добавление 10 мг/л вещества приводило к ингибированию роста, снижению pH культуральной среды, синтеза пигментов, процессов выработки кислорода уже на вторые сутки опыта, с увеличением экспозиции все процессы восстанавливались, однако не достигали контрольного уровня.

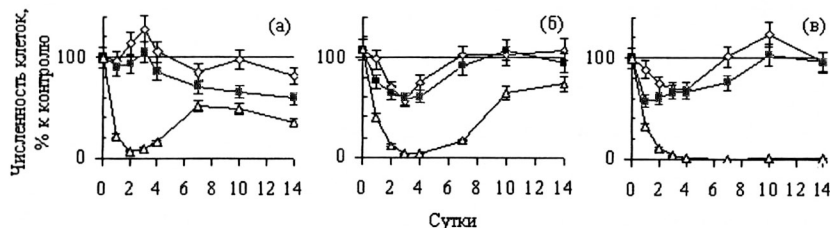


Рис. 3. Действие додецилсульфата натрия (а), детергентов “Обычный порошок” (б) и “Ariel” (в) на динамику численности клеток *Attheya ussurensis*.

Детергенты “Обычный порошок” и “Ariel” в концентрациях 0.1 и 1 мг/л вызывали сходные изменения числа клеток (рис. 3б,в), pH культуральной среды, содержания фотосинтетических пигментов и кислородной продуктивности *A. ussurensis*: в начале опыта происходило снижение числа клеток, замедление физиологических процессов, но к 14-м сут они восстанавливались. В тоже время содержание кислорода в среде при данных концентрациях детергента “Обычный порошок” на всем протяжении экспозиции превышало таковое в контроле, а в опыте с детергентом “Ariel” незначительно отличалось от контрольного. Увеличение концентрации детергентов до 10 мг/л приводило к более существенным нарушениям. В целом, детергент “Ariel” оказал более негативное

воздействие на микроводоросль: даже к завершению эксперимента ее популяция не восстанавливалась.

Plagioselmis prolonga

Концентрации 0.1 и 1 мг/л ДСН вызвали увеличение численности клеток *P. prolonga* (рис. 4а), особенно на десятые сутки экспозиции, остальные показатели отличались менее значительно от таковых в контроле.

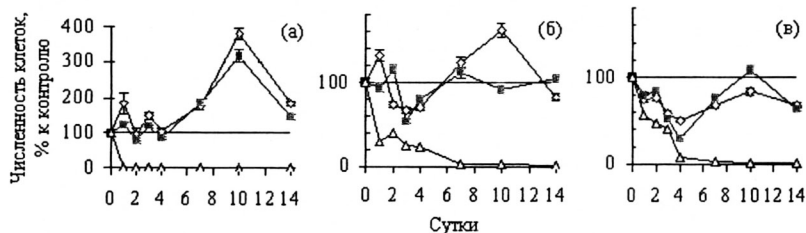


Рис. 4. Действие додецилсульфата натрия (а), детергентов “Обычный порошок” (б) и “Ariel” (в) на динамику численности клеток *Plagioselmis prolonga*.

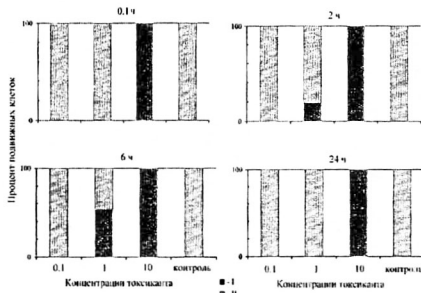


Рис. 5. Процент подвижных клеток *Plagioselmis prolonga* при добавлении поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия (мг/л): (I) – неподвижные клетки, (II) – подвижные клетки.

Через 2 – 6 ч при данных концентрациях отмечено появление неподвижных клеток, изменение скорости движения происходили уже через 0.1 ч (рис. 5). Содержание 10 мг/л вещества вызывало гибель популяции через сутки опыта, потеря подвижности всеми клетками отмечена через 0.1 ч эксперимента.

Под воздействием 0.1 и 1 мг/л детергентов “Обычный порошок” и “Ariel” численность клеток (рис. 4б,в) и показатели физиологического состояния *P. prolonga* в начале эксперимента снижались, а к его завершению не отличались от контрольных, кроме содержания каротиноидов, которое достоверно превышало таковое в контроле. Добавление 10 мг/л детергентов ингибировало рост и

физиологические процессы водоросли, особенно к концу опыта. Детергент “Обычный порошок” в концентрациях 0.1 и 1 мг/л не оказал влияния на подвижность клеток микроводоросли, а при внесении 10 мг/л токсиканта все клетки обездвиживались через 0.1 ч (рис. 6.).

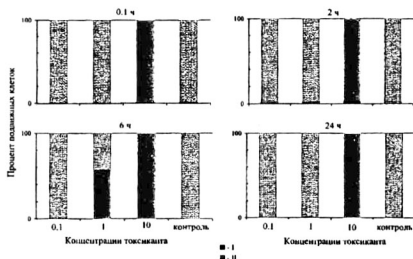


Рис. 6. Процент подвижных клеток *Plagioselmis prolonga* при добавлении детергента “Обычный порошок” (мг/л): (I) – неподвижные клетки, (II) – подвижные клетки.

При этом детергент “Ariel” оказал более негативное воздействие на *P. prolonga*, чем “Обычный порошок”. Кроме того, детергент “Ariel” оказал существенное отрицательное воздействие и на подвижность клеток и скорость их движения: утрату подвижности у клеток наблюдали при всех уровнях содержания токсиканта через 0.1 ч опыта (рис. 7), количество неподвижных клеток возрастало с увеличением уровня содержания токсиканта в среде.

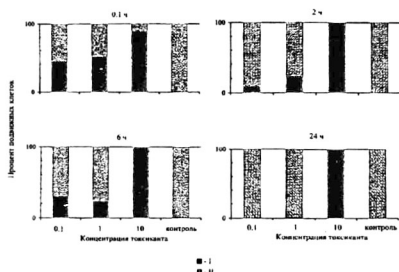


Рис. 7. Процент подвижных клеток *Plagioselmis prolonga* при добавлении детергента “Ariel” (мг/л): (I) – неподвижные клетки, (II) – подвижные клетки.

В наших экспериментах показано, что действие детергентов на водоросли носит незакономерный, фазный характер, такое же явление наблюдал и Л.П. Брагинский с соавторами (1987) в своих исследованиях.

Таким образом, наиболее чувствительными к действию ПАВ и детергентов оказались *P. prolonga* и *A. ussurensis*, наименее – *D. salina*. Такие эксперименты являются модельными, позволяющими выявить отклик организма на исследуемый

загрязняющий агент. Однако в реальных условиях в морской воде содержится огромное количество токсикантов. На основе полученных данных мы предположили, что микроводоросли, проявив чувствительность к отдельным токсическим агентам, могут дать отклик и на комплекс загрязняющих веществ, содержащихся в морской воде. С этой целью мы предприняли попытку биотестирования морской воды из районов зал. Петра Великого с разной антропогенной нагрузкой: восточной части Амурского залива, где расположен крупный город-порт Владивосток; зал. Восток, испытывающего сезонное влияние отдыхающих, и юго-западной части зал. Петра Великого, куда впадает р. Туманная, поставляющая широкий спектр загрязняющих веществ. Необходимо отметить, при биотестировании отклонение от контроля как в сторону уменьшения численности клеток, так и в сторону увеличения несет негативное последствие для экосистем и сигнализирует о неблагоприятном состоянии среды.

Ранее сотрудники ТИНРО-Центра для биотестирования вод Амурского залива и зал. Находка использовали мизид и предличинку анчоуса (Черкашин и др., 2004; Черкашин, Щеглов, 2004; Черкашин, Вейдеман, 2005), а данные по биотестированию вод с помощью микроводорослей отсутствуют.

В 2003 году качество вод из зал. Петра Великого оценивали с помощью *D. salina*. Показано, что в течение трех суток опыта численность клеток в воде, отобранной в акватории Амурского залива, была значительно выше такового в контроле (рис. 8а).

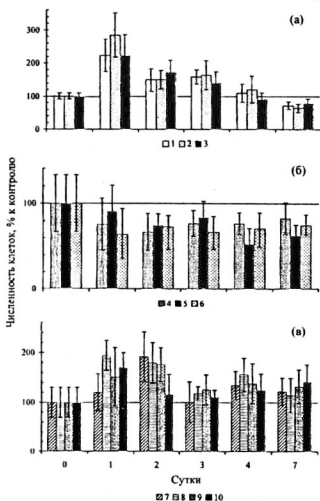


Рис. 8. Динамика численности клеток *Dunaliella salina* (% к контролю) в воде из зал. Петра Великого в 2003 г. (а) – Амурский залив, (б) – зал. Восток, (в) – юго-западная часть зал. Петра Великого. Номера станций соответствуют приведенным на рис. 1.

С увеличением экспозиции происходило существенное отставание роста культуры микроводоросли в тестируемой воде по сравнению с контрольной, особенно ярко выраженное к концу опыта.

В воде со всех станций зал. Восток (4 – 6) число клеток в течение опыта было ниже такового в контроле (рис. 8б).

Численность клеток в воде со всех станций юго-западной части зал. Петра Великого (станции 7 – 10) в течение 2-х сут была выше контрольной (рис. 8в). К концу опыта увеличение числа клеток становилось менее интенсивным, и их количество в воде со станций 8 и 10 сравнивалось с таковым в контроле, а в воде со станций 7 и 9 отмечено отставание в росте.

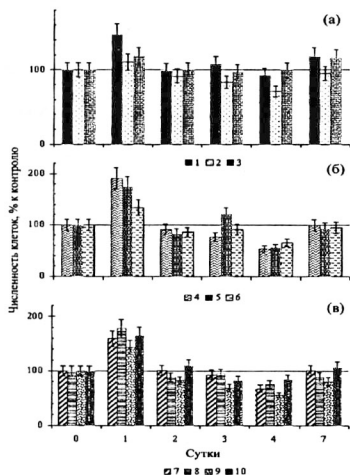


Рис. 9. Динамика численности клеток *Dunaliella salina* (% к контролю) в воде из зал. Петра Великого в 2006 г. (а) – Амурский залив, (б) – зал. Восток, (в) – юго-западная часть зал. Петра Великого. Номера станций соответствуют приведенным на рис. 1.

В 2006 году проводили биотестирование воды из зал. Петра Великого с применением *D. salina* и *P. prolonga*. В воде со всех станций в Амурском заливе через сутки после начала опыта наблюдали существенное увеличение количества клеток *D. salina* (рис. 9а), а на станциях 1 и 3 численность клеток практически не отличалась от контрольной на протяжении экспозиции. Иную картину наблюдали в воде со станции 2: через двое суток после начала эксперимента отмечено ингибирование роста *D. salina* и только к концу экспозиции численность клеток достигала контрольной.

В воде со всех станций из зал. Восток отмечено выраженное увеличение количества клеток микроводоросли в первые сутки опыта (рис. 9б). В

последующие дни эксперимента численность клеток снижалась, и к концу опыта стабилизировалась, достоверно не отличаясь от контрольной.

В воде со всех станций в юго-западной части зал. Петра Великого через сутки отмечали стимуляцию роста *D. salina* (рис. 9в) также как при тестировании воды из Амурского залива и зал. Восток. Со второго дня экспозиции интенсивность роста микроводоросли снижалась. Однако начиная с 7-х сут численность клеток во всех вариантах опыта не значительно отличалась от контрольной.

Число клеток *P. prolunga* снижалось уже в первые сутки в воде со всех станций в Амурском заливе по сравнению с таковым в контроле (рис.10).

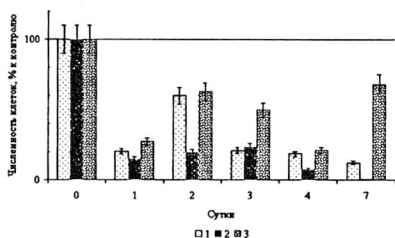


Рис. 10. Динамика численности клеток *Plagioselmis prolunga* (% к контролю) в воде из Амурского залива. Номера станций соответствуют приведенным на рис. 1.

Динамика численности популяций была одинаковой в воде со станций 1 и 3 в течение четырех суток опыта, к 7-м сут в воде со станции 3 количество клеток восстанавливалось, но не достигало такового в контроле. В воде со станции 2 рост популяции был самым слабым и концу опыта число клеток составляло 0.6% от контроля. Тестируемая вода оказывала выраженное отрицательное воздействие также и на подвижность клеток *P. prolunga*: обездвиженные клетки обнаруживались уже после 0.1 ч опыта. С увеличением экспозиции их процент возрастал и через 24 ч все клетки обездвиживались. Скорость движения клеток в воде со всех станций через 0.1 ч не отличалась от таковой в контроле, но уже через 2 ч скорость движения клеток снижалась. К концу опыта клетки в воде со всех станций были неподвижными.

Таким образом, проведенное биотестирование с применением микроводорослей подтверждает сведения о значительном загрязнении воды из районов зал. Петра Великого с разной антропогенной нагрузкой (Вашенко, 2000; Христофорова и др., 2002; Бабич, Бузолева, 2006; Лукьянова, 2006). Обращает на

себя внимание, что отклик *P. prolunga* и *D. salina* на тестируемую воду был неодинаков, что согласуется с полученными данными при определении степени чувствительности организмов с применением бихромата калия.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что по убыванию чувствительности к бихромату калия исследованные одноклеточные водоросли можно расположить в следующий ряд *Attheya ussurensis* > *Plagioselmis prolunga* > *Dunaliella salina*.
2. Установлено, что проведение оценки токсичности ПАВ и детергентов должно проводиться с использованием маточной культуры водоросли в экспоненциальной фазе роста в засевной концентрации клеток 4×10^4 кл/мл; с введением токсиканта в день постановки опыта.
3. Наиболее негативное воздействие ПАВ и детергенты в опытах с *D. salina* и *P. prolunga* оказывают на содержание хлорофилла *a* и каротиноидов и кислородную продуктивность, наименее – на изменение pH культуральной среды, численность клеток и скорость роста популяции. Подвижность клеток *P. prolunga* и скорость их движения под действием токсикантов изменялась уже в начале опыта.
4. Наиболее отрицательное воздействие ПАВ и детергенты в опытах с *A. ussurensis* оказывают на численность клеток, скорость их роста и кислородную продуктивность микроводоросли, наименее – на изменение pH культуральной среды и содержание фотосинтетических пигментов.
5. ПАВ и детергенты оказывают влияние на *D. salina*, *A. ussurensis* и *P. prolunga* при всех исследованных концентрациях. Воздействие токсикантов усиливается с увеличением уровня их содержания в среде.
6. Тестируемая вода из зал. Петра Великого во всех случаях вызывала отклонение числа клеток *D. salina* от контрольного, что подтверждает факт неблагоприятного состояния акваторий залива.
7. В воде из Амурского залива наблюдали выраженное ингибирование популяции *P. prolunga*. Подвижность клеток – наиболее чувствительна к действию

тестируемой воды. *P. prolunga* является перспективным тест-объектом для оценки качества среды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах

1 Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. *Dunaliella salina* (Chlorophyta) как тест-объект для оценки загрязнения морской среды детергентами // Биология моря. 2005. Т. 31, № 4. С. С. 274 – 279.

2 Айздайчер Н.А., Маркина Ж.В. Токсическое действие детергентов на водоросль *Plagioselmis prolunga* (Cryptophyta) // Биология моря. 2006. Т. 32, № 1. С. 50 – 54.

3 Журавель Е.В., Маркина Ж.В., Христофорова Н.К., Айздайчер Н.А. Использование микроводоросли *Dunaliella salina*, эмбрионов и личинок плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* как тест-организмов для оценки качества воды в заливе Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2006. Т. 32, № 3. С. 188 – 196.

4 Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Влияние детергентов на динамику численности и физиологическое состояние бентосной микроводоросли *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) в лабораторной культуре // Биология моря. 2007. Т. 33, № 6. С. 432 – 439.

5 Маркина Ж.В. Использование микроводоросли *Plagioselmis prolunga* для оценки качества воды из Амурского залива и залива Находка (Японское море) // Биология моря. 2008. Т. 34, № 1. С. 35 – 41.

6 Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Биотестирование воды из зал. Петра Великого (Японское море) с помощью микроводоросли *Dunaliella salina* // Экология. 2008. № 3. С. 196 – 200.

Работы, опубликованные в материалах региональных, всероссийских и международных конференций

7 Воробьева Ж.В., Айздайчер Н.А., Журавель Е.В. Зависимость действия детергента на микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta) от возраста маточной культуры // V Региональная конференция по актуальным проблемам морской биологии и экологии студентов, аспирантов и молодых ученых Дальнего

Востока России (г. Владивосток, 21-24 ноября 2002 г.). Тез. докл. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2002. С. 28-29.

8 Воробьева Ж.В. Влияние додецилсульфата натрия на кислородную продуктивность микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyta) // Тез. докл. 7-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых (г. Пущино, 14-18 апреля 2003 г.) "Биология - наука XXI века". Пущино: Пущинский научный центр РАН. 2003. С. 160-161.

9 Маркина Ж.В. Анализ влияния детергента на различные виды микроводорослей // VII Дальневосточная молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии (МЭС ТИБОХ, 15-22 сентября 2003 г.). Тез. докл. Владивосток: ДВО РАН. 2003. С. 35-36.

10 Маркина Ж.В. Действие додецилсульфата натрия на микроводоросли *Dunaliella salina* (Chlorophyta) и *Gymnodinium kovalevskii* (Dinophyta) // Тез. докл. VI Региональной конференции по актуальным проблемам морской биологии и экологии студентов, аспирантов и молодых ученых Дальнего Востока России (г. Владивосток, 20-22 ноября 2003 г.). Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2003. С. 61-62.

11 Маркина Ж.В. Влияние синтетического моющего средства "Ariel" на рост микроводоросли *Dunaliella salina* // Тез. докл. Биология наука XXI века: 8-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (г. Пущино, 17-21 мая 2004 г.). Пущино: Пущинский научный центр РАН. 2004. С. 214.

12 Маркина Ж.В. Влияние прибрежных вод г. Владивостока на микроводоросль *Dunaliella salina* (Chlorophyta) // Научные труды международного биотехнологического центра МГУ: тез. докл. 2-ой международной научной конференции "Биотехнология – охране окружающей среды" и 3-ей школы-конференции молодых ученых и студентов "Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов" (г. Москва, 25-27 мая 2004 г.). М.: Спорт и культура. 2004. С. 125.

13 Markina Zh.V. Evaluation of water quality from the south-west part of Peter the Great Bay (Near The Tumen river mouth using *Dinaliella salina* Teod. (Chlorophyta) // "Bridges of science between north America and the Russian Far East: past, present and future". Proceedings of an international conference on the Arctic and North Pacific (Vladivostok, 14th-16th September of 2004). Vladivostok: Dalnauka, 2004. P. 54

14 Маркина Ж.В. Оценка влияния синтетического моющего средства "Ariel" на микроводоросль *Plagioselmis prolunga* (Cryptophyta) // Тез. докл. VII Региональной конференции по актуальным проблемам морской биологии и экологии студентов, аспирантов, молодых преподавателей и сотрудников ВУЗов и научных организаций Дальнего Востока России. (г. Владивосток, 18-20 ноября 2004) г. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 2004. С. 83-84.

15 Маркина Ж.В. Оценка подвижности клеток микроводоросли как экспресс-метод определения степени токсического воздействия // Тез. докл. IX Молодежной школы-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (МЭС ТИБОХ, 16-23 сентября 2005 г.). Владивосток: ДВО РАН. 2005. С. 37.

16 Маркина Ж.В. Воздействие детергента «Ariel» на бентосную морскую микроводоросль *Attheya ussurensis* (Bacillariophyta) // X Международная молодежная Школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, (МЭС ТИБОХ, 12-19 сентября 2006 г.) Тез. докл. Владивосток: ДВО РАН. 2006. С. 29.

17 Маркина Ж.В., Журавель Е.В. Биотестирование вод залива Находка (Японское море) // “Экологические проблемы использования прибрежных морских акваторий”. Материалы междунар. научно-практич. конференции. (г. Владивосток, 26 – 28 октября 2006 г.) Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. С. 136 – 139.

18 Маркина Ж.В. Влияние детергента на физиологическое состояние планктонной и бентосной микроводорослей // “Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов”. Материалы 2-ой научной конференции с участием стран СНГ (г. Петрозаводск, 11-14 сентября 2007 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. С. 87-88.

19 Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А., Журавель Е.В. Биотестирование воды из Амурского залива с помощью культуры микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta) // Материалы междунар. научно-практич. конференции “Морская экология-2007” (г. Владивосток, 2007, 3-5 октября 2007). Владивосток: МГУ им. Невельского. 2007. С. 152 – 156.

МАРКИНА Жанна Васильевна

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
МОРСКОЙ ВОДЫ И ДЕЙСТВИЯ ДЕТЕРГЕНТОВ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Зак. № 93п. Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Усл. п. л. 1,0. Тираж 100 экз.

Подписано в печать 26.08.2008 г.

Печать офсетная с оригинала заказчика.

Отпечатано в типографии ОАО «Дальприбор»
690105, г. Владивосток, ул. Бородинская, 46/50,
тел. 32-70-49.

E-mail: press-dpr@rambler.ru

